

## NASA 型 HDM2-p53 タンパク質間相互作用不可逆阻害剤 (2) : 細胞内 HDM2 に対する反応性評価

(京大院工<sup>1</sup>・リーズ大学<sup>2</sup>) ○田村 朋則<sup>1</sup>・上田 毅<sup>1</sup>・河野 正晴<sup>1</sup>・塩野 恵也<sup>1</sup>・Fruzsina Hobor<sup>2</sup>・Andrew Wilson<sup>2</sup>・浜地 格<sup>1</sup>

NASA-type irreversible inhibitor for HDM2-p53 protein-protein interaction (2): Evaluation of reactivity for intracellular HDM2 (<sup>1</sup>*Graduate School of Engineering, Kyoto University*, <sup>2</sup>*School of Chemistry, University of Leeds*) ○Tomonori Tamura,<sup>1</sup> Tsuyoshi Ueda,<sup>1</sup> Masaharu Kawano,<sup>1</sup> Keiya Shiono,<sup>1</sup> Fruzsina Hobor,<sup>2</sup> Andrew Wilson,<sup>2</sup> Itaru Hamachi<sup>1</sup>

Based on NASA-type irreversible inhibitors for HDM2, we also prepared their analogs containing an alkyne in the Nutlin ligand moiety as detection tag and evaluated their reactivities for HDM2 N-terminal domain expressed in live cells. In this experiment, HA-HDM2<sub>1-125</sub>, in which the original N-terminus is masked with a HA tag, and HDM2<sub>1-125</sub> with a Y67F mutation were transiently expressed in HEK293T cells. It was revealed that the modification site specificity and reaction efficiency differed depending on the spacer structure. Notably, compound **6** that did not react at all with the purified HDM2<sub>1-125</sub>, site-specifically labeled the N-terminus of intracellular HDM2, indicating that the spatial configuration of the N-terminus is significantly different between purified HDM2 and intracellular HDM2. We then examined the labeling of endogenous HDM2 (full-length), which showed that compound **5** was the most selective for endogenous HDM2.

**Keywords** : Irreversible inhibitor, N-acyl-N-alkyl sulfonamide (NASA), Covalent inhibitor

前発表で評価した NASA 型 HDM2 不可逆阻害剤を基本骨格として、Nutlin リガンド部位に検出タグとしてアルキンを導入した阻害剤アナログを合成し、細胞内で強制発現させた HDM2-N 末端ドメイン(1-125 a.a.)に対する反応性を評価した。ここでは精製 HDM2 における修飾部位として同定された N 末端アミノ基と Tyr67 に対する反応部位特異性を評価するために、天然型 HDM2<sub>1-125</sub>に加えて、N 末端を HA tag でマスクした HA-HDM2<sub>1-125</sub> と、Tyr67 を Phe に変異した HDM2<sub>1-125</sub> (Y67F)を HEK293T 細胞に一過的に発現させ実験に使用した。その結果、スペーサー構造の違いによって、修飾部位特異性や反応効率が異なることが明らかとなった。特に、最もスペーサーの短い化合物 **6** は精製 HDM2<sub>1-125</sub> に対しては全く不可逆阻害反応が進行しないにもかかわらず、細胞内 HDM2<sub>1-125</sub> に対しては N 末端特異的に反応が進行した。このことから、試験管内と細胞内で HDM2 の N 末端の立体配置や dynamics が大きく異なることが示唆された。続いて、細胞内在性 HDM2(full-length)に対する反応評価を行った結果、化合物 **5** が最も選択性高く HDM2 を不可逆阻害することが明らかとなった。

